

24.08.98

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D	09 OCT 1998
WIPO	PCT

09/147947

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年 7月24日

出願番号
Application Number:

平成 9年特許願第213969号

出願人
Applicant(s):

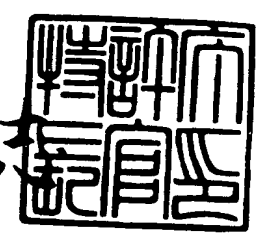
サントリー株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 9月25日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山佐建



出証番号 出証特平10-307627

【書類名】 特許願
【整理番号】 973981
【提出日】 平成 9年 7月24日
【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 CI2N 15/12
【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼ
【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
株式会社 生物医学研究所内

【氏名】 鶴岡 伸夫

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
株式会社 生物医学研究所内

【氏名】 山城 恭子

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新御霊口町2 8
5-7 9

【氏名】 山口 希

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9300154

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 図7～12に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

【請求項2】 図7～12に示すアミノ酸番号578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼドメインまたはその部分ペプチド。

【請求項3】 図7～12に示すアミノ酸番号40から112までのアミノ酸配列からなるクリングルドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるクリングルドメインまたはその部分ペプチド。

【請求項4】 図7～12に示すアミノ酸番号117から217まで、番号227から327まで、番号334から433までまたは番号447から547までのアミノ酸配列からなるスカベンジャーレセプターシステインリッチ（SRCR）ドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるSRCRドメインまたはその部分ペプチド。

【請求項5】 請求項1から4のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項6】 請求項1から4のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ

、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチド活性を有するペプチドをコードするDNA。

【請求項7】 請求項5または6に記載のDNAを含んでなる発現ベクター

【請求項8】 請求項7に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

【請求項9】 請求項8に記載の宿主を培養または飼育し、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを採取することを特徴とするセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドの製造法。

【請求項10】 請求項1から4のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを抗原とする抗体。

【請求項11】 請求項1から4のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは請求項5または6に記載のDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規セリンプロテアーゼ、それをコードするDNA、及び該セリンプロテアーゼの製造方法、並びに該セリンプロテアーゼまたはそれをコードするDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

セリンプロテアーゼは、動物、植物、微生物に広く存在し、特に、高等動物では、食物の消化、血液凝固・線溶、補体活性化、ホルモン産生、排卵・受精、食作用、細胞増殖、発生・分化、老化、癌転移など極めて多くの生体反応に關与していることがわかっている (Neurath, H. Science, 224, 350-357, 1984)。

【0003】

近年、中枢神経系においてもセリンプロテアーゼが生理的に重要な機能分子と

して働いていることが確認されるようになった。例えば、脳内において発現しているセリンプロテアーゼとしては、組織型プラスミノーゲンアクチベーター (Sappiro, A-D., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J.Z., Wohlwent, A., and Vassalli, J-D., J.Clin. Invest., 92, 679-685, 1993)、トロンピン (Monard, D., Trends Neurosci., 11, 541-544, 1988)、ヒトリプシンIV (Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Muller-Hill, B., Gene, 136, 167-175, 1993)、ニューロプシン (Chen, Z-L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., and Shiosaka, S., J. Neurosci., 15(7), 5088-5097, 1995)、ニューロシン (Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Kodama, S., Tsujimoto, M., Yamamura, Y., Tanaka, T., Nakazato, H., and Yamaguchi, N., Biochim. Biophys. Acta, 1350, 11-14, 1997)などが知られている。

【0004】

これら脳内におけるセリンプロテアーゼは、ニューロンの神経突起の伸展に関与するばかりでなく、標的ニューロンとのシナプス形成過程に関与していることが想定されている (Liu, Y., Fields, R.D., Fitzgerald, S., Festoff, B.W., and Nelson, P.G., J. Neurobiol., 25, 325, 1994)。

しかしながら、これらセリンプロテアーゼの脳内における生理機能についてはほとんど解明されていない。また、脳内に発現し重要な生理機能を担うセリンプロテアーゼがその他多数存在することが予想されるがその多くは特定されていないのが現状である。

【0005】

一方、凝固線溶補体系のある種のセリンプロテアーゼタンパク質は、クリングルドメイン、EGF-like構造、フィンガー構造、 γ -carboxy glutamic acidドメインならびにアップルドメインなどの構造をN末端側に有している (Furie, B., and Furie, B.C., Cell, 53, 505-518, 1988)。例えば、クリングルドメインを持つセリンプロテアーゼタンパク質としてはウロキナーゼ、プラスミノーゲンアクチベーター、プラスミノーゲンなどが知られている。

【0006】

クリングルドメインは、フィブリン、ヘパリンおよびリシンアナログとの結合

能を有し (Scanu, A.M. and Edelstein, C., *Biochimica. Biophysica. Acta*, 1256, 1-12, 1995)、血液線溶系においては、析出したフィブリンにプラスミノゲンアクチベーターがクリングルドメインを介して結合し、近傍に結合したプラスミンを活性化することが示されている。さらに、血管新生抑制因子アンジオスタチンが、プラスミノゲン分子中のクリングルドメインであることが明らかとなり (Ca o, Y., Ji, R.W., Davidson, D., Scaller, J., Marti, D., Soehndel, S., McCance, S.G., O'Reilly, M.S., Llinas, M., and Folkman, J., *J. Biol. Chem.*, 271, 29461-29467, 1996)、クリングルドメイン構造単独の生理活性が初めて示された。

【0007】

また、マクロファージスカベンジャーレセプターにおいて認められたスカベンジャーレセプターシステインリッチ (SRCR) ドメイン構造を有する一連のタンパク質群として、サイクロフィリンC結合蛋白質、スペラクト (S p e r a c t) レセプター、コンプリメントファクターI、CD5、CD6などの存在が知られている (Resnick, D., Pearson, A., and Krieger, M., *Trends. Biochem. Sci.*, 19, 5-8, 1994)。

【0008】

サイクロフィリンC結合蛋白質やコンプリメントファクターIは分泌タンパク質であるのに対して、スペラクト (S p e r a c t) ファクターやCD5およびCD6は、膜結合型タンパク質であることが知られている。このうち、膜結合型タンパク質CD6と結合するタンパク質が活性化白血球接着分子 (ALCAM) であることが見い出され、CD6のSRCRドメイン構造に結合位置があることがわかった (Whitney, G.S., Starling, G.C., Bowen, M.A., Modrell, B., Siadak, A.W., and Aruffo, A., *J. Biol. Chem.*, 270, 18187-18190, 1995)。

【0009】

さらに、CD6のリガンドであるALCAMは、活性化リンパ球やニューロンに発現していることが知られており、CD6は、ALCAMとの相互作用を介して免疫系や神経系における恒常性の維持に一定の制御機能を果たしていることが推察される。

このように、複数のドメイン構造を有するタンパク質は、各ドメインが固有の

機能を有するばかりでなく、各ドメインの機能が連関して特異的な認識機能を持って機能しているものと考えられている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記の実情に鑑みてなされたものであり、その目的は新規なセリンプロテアーゼ、及びそれをコードする新規セリンプロテアーゼDNAを提供することにある。さらに、本発明は当該DNAを用いて当該プロテアーゼを大量に生産する方法及び該セリンプロテアーゼまたはそれをコードするDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法を提供することを目的とするものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、脳内に発現するセリンプロテアーゼをコードするcDNAに良く保存されている領域をプローブとして用い、5' 翻訳領域が特徴的なcDNAをスクリーニングすることにより、新規機能タンパク質をコードするcDNAを単離し、本発明を完成させるに至った。

【0012】

【具体的な説明】

マウスセリンプロテアーゼをコードするcDNAのクローニングは、先ず、常法に従って単離調製したマウス脳由来mRNAからcDNAライブラリーを作製し、次に、作製したcDNAライブラリーをセリンプロテアーゼモチーフをもとにデザインしたPCRプライマーを用いたPCRにより行なった。ここで得られたPCR産物をプローブとして、5' 翻訳領域が長く新規機能タンパク質をコードすると予想されるクローンのスクリーニングを実施した。

【0013】

その結果、本発明者らは、マウスBSSP-3と命名した2.7kbのcDNAを単離することに成功した。得られたcDNA配列を常法により調べた結果、マウスBSSP-3 cDNAは、セリンプロテアーゼドメインばかりでなくクリングルドメインならびにスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。単離したマウ

スBSSP-3 cDNAは、1つのクリングルドメイン、3つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていた。具体例を実施例1に記載する。

【0014】

次に、単離したマウスBSSP-3 cDNA全長をプローブとして、マウス各臓器およびマウス脳各部位におけるマウスBSSP-3 mRNAの発現を確認したところ、マウス各臓器においては、特に脳に強い発現を認め、肺および腎臓においても発現を認めた。また、マウス脳各部位においては、大脳および脳幹に強い発現を認め、延髄においても発現を認めた。その大きさはいずれの場合においても約2.7kbの大きさのみであった。検討した脳各部位のうち、マウスBSSP-3 mRNAの発現は小脳では認められなかった。具体例を実施例2に記載する。このことから、マウスBSSP-3 mRNAは、実際にマウス臓器で発現していることが確認された。

【0015】

さらに、マウスBSSP-3 cDNAをプローブにしてヒト脳cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、ヒトBSSP-3 cDNAを単離することに成功した。その結果、本発明者らは、ヒトBSSP-3 cDNAがマウスBSSP-3 cDNAの一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、1つのクリングルドメイン、4つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていることを明らかにした。具体例を実施例3に記載する。さらに、本発明者は、ヒトBSSP-3 cDNAのうちセリンプロテアーゼ成熟タンパク質をコードするDNAをCOS-1細胞で発現したところ、明らかに酵素活性を持つ機能タンパク質であることを明らかにした。具体例を実施例4に記載する。

【0016】

以上の結果から、今回単離したマウスおよびヒトBSSP-3 cDNAは、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼドメイン、新規クリングルドメインならびに新規スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードしていることばかりでなく、セリンプロテアーゼドメインが

酵素活性を持った機能タンパク質であることが明らかとなった。

【0017】

本発明における新規機能タンパク質は、一次構造上複合的な機能を有することが明らかであるばかりでなく、その複合的な機能を通して脳内の生理機能に一定の役割を果たしている。したがって、本発明のマウスBSSP-3 cDNAおよびマウスBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種マウス疾患モデルの病態解析に有用な手段を提供するものである。また、病態解析を通じて得られた疾患治療のための有用な情報を基に、本発明のヒトBSSP-3 cDNAおよびヒトBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種疾患治療剤をスクリーニングする手法を提供するものであり、さらに実際のヒト疾患治療薬の開発に適用することも可能である。

【0018】

その治療法としては、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療が挙げられる。さらに、新規機能タンパク質の各ドメイン構造のそれぞれは、単独で機能することもまた可能である。したがって、各ドメイン構造を個別に発現させた後、各ドメイン構造と相互作用を示す分子を特定することができる。また、特定した分子群の疾患への関与を調べることにより、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療も可能である。

【0019】

以下、実施例に基づいて本発明を説明する。

本発明においては、新規セリンプロテアーゼをコードするDNAのヌクレオチド配列として図1～6および図7～12に示すヌクレオチド配列を開示するが、本発明のセリンプロテアーゼのDNAはこれに限定されない。一旦、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列が決定されれば、コドンの縮重に基き、同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を設計し、それを調製することができる。この場合、使用すべき宿主により高頻度で用いられるコドンを使用するのが好ましい。

【0020】

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードするDNAを得るには、実施例に記載する様にしてcDNAを得ることができるが、これに限定されない。すなわち、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列をコードする1つのヌクレオチド配列が決定されれば天然セリンプロテアーゼをコードするDNAは、本発明に具体的に開示するストラテジーとは異なるストラテジーによりcDNAとしてクローニングすることができ、さらにはそれを生産する細胞のゲノムからクローニングすることもできる。

【0021】

例えば、実施例1に示すようなDNA（ヌクレオチド）プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）によりクローニングすることができる。

本発明のDNAはさらにセリンプロテアーゼ活性を有する蛋白または糖蛋白をコードし、図1～6または図7～12のヌクレオチド配列とハイブリダイズするDNAも含まれる。また、ハイブリダイゼーションの一般的方法は当業者においてよく知られており（例えば、実験医学臨時増刊号、羊土社、バイオテクノロジー実験法シリーズ遺伝子工学総集編”、Vol. 5, No. 11, 24-60, 1987）、活性測定もまた当業者によく知られている。

【0022】

ゲノムからクローニングする場合、実施例において使用した種々のプライマーヌクレオチド又はプローブヌクレオチドを、ゲノムDNA断片の選択のためプローブとして使用することができる。また、図1～6または図7～12に記載するヌクレオチド配列に基いて設計された他のプローブを用いることもできる。ゲノムから目的とするDNAをクローニングするための一般的方法は当業界においてよく知られている（Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons社、第5章及び第6章）。

【0023】

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードするDNAはまた、化学合成によっても調製することができる。DNAの化学合成は当業界において自動DNA合成機、例えばアプライドバイオシステム社396 DNA/RNA合成機など採用して容易である。従って、当業者は、図1～6または図7～12に示されるヌクレ

オチド配列のDNAを容易に合成することができる。

【0024】

本発明の天然型セリンプロテアーゼを生来のコドンとは異なるコドンによりコードするDNAは、前記のごとく化学合成により調製することもでき、また図1～6または図7～12に示すヌクレオチド配列を有するDNA又はRNAを鋳型として変異誘発プライマーと共に用いる部位特定変異誘発法 (site-directed mutagenesis) 等常法に従って得ることもできる (例えば、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons社、第8章を参照のこと)。

【0025】

こうして、一旦アミノ酸配列が決定されれば、この天然アミノ酸配列に1～複数のアミノ酸が付加されておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列から1～複数個のアミノ酸が除去されておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列中の1～複数個のアミノ酸が他のアミノ酸により置き換えられておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、さらには、上記のアミノ酸付加変異、アミノ酸除去変異及びアミノ酸置換変異が組合わされた変異を有しなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチドなど、種々の変異型セリンプロテアーゼを設計し、それを製造することができる。

【0026】

上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の変異におけるアミノ酸の数は、特に限定されないが、付加については、例えば、本発明のセリンプロテアーゼとのハイブリッド蛋白に用いられる機能性蛋白のアミノ酸の数 (例えば、マルトースバインディングプロテイン (maltose-binding protein) 等の公知の抽出精製もしくは安定化用蛋白または各種生理活性蛋白や本セリンプロテアーゼに付加されたシグナルペプチドのそれに依存し、すなわち、当該変異の目的に依存して決定される。例えば、1～50、好ましくは、1～10の付加があげられる。

【0027】

また、除去については、除去されるアミノ酸の数は、セリンプロテアーゼ活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～30、好ましくは1～20、また、本セリンプロテアーゼの活性領域以外の領域のアミノ酸の数があげられる。さらに、置換については、置換されるアミノ酸の数は、セリンプロテアーゼ活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～10、好ましくは、1～5があげられる。

【0028】

また、本発明においては、図1～6または図7～12に示すそれぞれアミノ酸番号517から761までまたは578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメイン、図1～6または図7～12に示すアミノ酸番号85から157までまたは40から112までのアミノ酸配列からなるクリングルドメイン、または図1～6または図7～12に示すそれぞれアミノ酸番号166から番号266まで、番号273から372までもしくは番号386から486までまたは番号117から217まで、番号227から327まで、番号334から433まで、もしくは番号447から547までのアミノ酸配列からなるスカベンジャーレセプターシステインリッチ（SRCR）ドメインを提供し、これらドメインの作製は、後記する方法またはそれ自体公知のペプチド合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼの切断により行うことができ、また本発明のドメインの活性を維持する変異型ドメインまたはそれをコードするDNAも同様に作製することができる。

【0029】

上記のようにして本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインのDNAが得られると、これを用いて、常用の遺伝子組換え法により組換えセリンプロテアーゼまたはドメインを製造することができる。すなわち、本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインをコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、そして得られた培養物（細胞又は培地）から目的とするセリンプロテアーゼまたはドメインを摂取する。

【0030】

本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインは、生化学的又は化学的な修飾、例えば、N末端アシル化、例えばホルミル化、アセチル化などのC₁₋₆ アシル化または欠失等がされた形で得られてもよい。発現系は、シグナル配列の付加、改良や宿主の選択によって分泌効率及び発現量の向上を図ることもできる。シグナル配列の付加及び改良手段としては、他の構造ペプチドのシグナルペプチドをコードする遺伝子を本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインの構造遺伝子5'側上流に、切断可能な部分ペプチドをコードする遺伝子を介するように連結する方法が挙げられる。具体的例示としては、実施例4に記載したトリプシン遺伝子のシグナル配列およびエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を用いる方法があげられる。

【0031】

宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、特に大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシルス属 (*Bacillus*) 細菌、例えばバシルス・ズブチリス (*B. subtilis*) 等を用いることができる。真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエー (*S. cerevisiae*)、等の真核性微生物、昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞 (*Spodoptera frugiperda*)、キャベツルーパー細胞 (*Trichoplusia ni*)、カイコ細胞 (*Bombyx mori*)、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等、具体的には、COS-1細胞、Vero細胞、CHO細胞、L細胞、ミエローマ細胞、C127細胞、BALB/c 3T3細胞、Sp-2/O細胞等を使用することができる。本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーパー等を用いることもできる。

【0032】

発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス (バキュロ (昆虫)、ワクチニア (動物細胞)) 等が使用できる。発現ベクター中のプロモーターは宿主細胞に依存して選択され、例えば細菌用プロモーターとしてはlacプロモーター、trpプロモーター等が使用され、酵母用プロモーター

としては、例えば、adhIプロモーター、pqkプロモーター等が使用される。

【0033】

また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルスポリヘドリンプロモーター等、動物細胞としてはSimian Virus 40のearlyもしくはlateプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターまたはSR α プロモーター等があげられる。また、発現ベクターには、以上の他にエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー（例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（メトトレキセート耐性）、neo遺伝子（G418耐性）等）等を含むものを用いるのが好ましい。なお、エンハンサーを使用する場合、例えばSV40のエンハンサー等を遺伝子の上流または下流に挿入する。

【0034】

発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons社、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。培養物からのセリンプロテアーゼまたはドメインの精製は、タンパク質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外濾過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。

【0035】

このようにして得られる本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインは、機能的タンパク質であることから、病態解析に有用な手段を提供し、本タンパク質を用いる生理活性物質のスクリーニングを可能とし、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索研究に有用である。スクリーニング方法の具体例として、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物のような、または、各種細胞培養上清等より得られる天然成分、各種合成化合物等の人工成分のような被験試料の生理活性の測定を行なうことにより、例えばセリンプロテアーゼ阻害物質の場合は、実施例4と同様にして、行うことができる。

また、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは前記したセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドをコードするDNAで形質転換された宿主もしくはその細胞膜画分を使用する上記生理活性測定、結合親和性測定等も本発明のスクリーニング方法の好ましい実施態様である。

また、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンスまたはアンチセンス法による遺伝子発現促進または抑制治療や生体的生理機能解析の有用な手段として提供され、解明された情報を基に新規医薬のスクリーニングにも用いられる。

【0036】

さらにまた、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードするDNAは、上記スクリーニング方法を実施する際に用いうる形態でもキットとして提供できる。

部分ペプチドとしては、活性部位のセリン残基の近傍に存在するペプチド断片および本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインに特異的な抗体の認識部位となり得るペプチド断片などの本発明のセリンプロテアーゼに特有の領域からなるペプチド断片を挙げることができる。なお、該部分ペプチドの作成は、本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインについて前記した方法またはそれ自体公知のペプチドの合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼまたはドメインの切断により行なうことができる。

【0037】

また、上記の細胞膜画分は、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドをコードするDNAを発現し得る宿主細胞を、発現が可能な条件下培養し、得られたセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドを含有する宿主細胞をそれ自体公知の方法で破碎した後、得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。

【0038】

本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドを用いる生理活性物質のスクリーニング方法は、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドもしくはそれをコードするDNAまたは該セリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドを含有する宿主細胞もしくはその細胞膜画分を用いて、被検試料をスクリーニングすることにより行なわれる。具体的方法として、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインおよびその部分ペプチドの基質、例えば、発色基質等の合成基質、放射性核種により標識された基質等、を用いる酵素活性測定法や結合親和性測定法により行なわれる。

【0039】

なお、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを含有する宿主細胞を用いる場合、それ自体公知の方法で細胞を固定化（グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド等で）して用いることができる。また、該プロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNAを用いる場合、遺伝子発現促進または抑制を評価する手法、例えばルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を用いて、行うことができる。

【0040】

【実施例】

実施例1. プローブ用新規セリンプロテアーゼモチーフcDNAのクローニング

(1) セリンプロテアーゼ保存領域を用いたPCR

マウス脳mRNAの調製は、RTG-T-primed first-strand kit (Pharmacia) を用いて添付の文書に従って行った。得られたmRNA 5 μ l (約6mg) にオリゴdTプライマー 2 μ l (1 μ g) を加え、70℃で10分間熱した後、氷中で急冷した。

【0041】

この熱変性mRNAに、4 μ l の 5x First strand buffer (250mM Tris-HCl pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1 μ l の 10mM dNTP, 2 μ l の 0.1M DTT, ジオチルピロカーボネート (DEPC) 処理した蒸留水および 5 μ l (1000

U) の Super Script II RT を加え、37℃で1時間反応させた。こうして得られた First strand cDNA をテンプレートとしてセリンプロテアーゼ保存領域を用いた PCR を行なった。

【0042】

プライマーとして、活性残基 (His) 近傍のアミノ酸保存領域 (N-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys) を基に配列番号: 1 に示すオリゴマー KY185 (5'-GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG-3') および活性残基 (Ser) 近傍のアミノ酸保存領域 (N-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu) を基に配列番号: 2 に示すオリゴマー KY189 (3'-CCV CTR AGD CCN CCN GGC GA-5) をそれぞれ合成したものを用いた。Taq DNA polymerase (Amersham 社) を用いて PCR を行った後、PCR 反応液を pCRII ベクター (Invitrogen 社) にサブクローニングした。

【0043】

(2) スクリーニング用マウス脳 mRNA の単離精製

マウス脳 mRNA の調製は、Fast Track mRNA Isolation kit (Invitrogen 社) を用いて添付の文書に従って行った。すなわち、摘出したマウスの全脳に 15ml の Lysis Buffer を加え、テフロンホモジナイザーでただちにホモジナイズした。ホモジナイズした組織は、注射筒を用いて 21 ゲージの注射針に 3 回通したのち、50ml の遠心管に入れ、45℃の水浴中で 1 時間インキュベーションした。

【0044】

インキュベーション後、4000×g で 5 分間遠心して得られた上清を別の 50ml の遠心管に入れ、そこに 5M NaCl 溶液を 950 μl 加えた後、再び注射筒を用いて 21 ゲージの注射針に 3 回通した。次に、この溶液にオリゴ (dT) セルロースを 1 錠加え、2 分間膨潤させた後、1 時間ゆっくり振動させた。1 時間後、2,000×g で 5 分間遠心し、上清を吸引した後、20ml の結合緩衝液に懸濁後、遠心した沈渣をさらに 10ml の結合緩衝液で洗浄した。

【0045】

次に、10mlの低塩濃度洗浄液で3回洗浄した。最終洗浄後、オリゴ(dT)セルロースを800 μ lの低塩濃度洗浄液に懸濁し、スピンカラムに入れ、5000 \times gで10秒間の遠心洗浄を3回繰り返した。洗浄後、200 μ lの溶離緩衝液を加え、5000 \times gで10秒間の遠心を2回繰り返すことにより400 μ lのmRNA溶液を得た。mRNA溶液から常法に従い、エタノール沈殿によりmRNAを回収し、20 μ lのDEPC処理した蒸留水に溶解した。

【0046】

(3) cDNAライブラリーからのスクリーニング

〈工程1〉 cDNAの合成

実施例1(2)で得られたmRNA5 μ l(約6 μ g)にオリゴdT Not Iプライマー2 μ l(1 μ g)を加え、70℃で10分間熱した後、水中で急冷した。この熱変性mRNAに、4 μ lの5 \times 第一鎖緩衝液(250mM Tris-HCl pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1 μ lの10mM dNTP, 2 μ lの0.1M DTT, DEPC処理した蒸留水および5 μ l(1000U)のSuper Script II RTを加え、37℃で1時間反応させた。

【0047】

次に、この反応液に91 μ lのDEPC処理した蒸留水、30 μ lの5 \times 第二鎖緩衝液(100mM Tris-HCl pH6.9, 450mM KCl, 23mM MgCl₂, 0.75mM β -NAD⁺, 50mM (NH₄)₂SO₄), 3 μ lの10mM dNTP, 1 μ l(10U)の大腸菌 DNA リガーゼ、4 μ l(40U)の大腸菌 DNA ポリメラーゼおよび1 μ l(2U)の大腸菌 RNase Hを加え、16℃で2時間反応後、2 μ l(10U)のT4 DNA ポリメラーゼを加え16℃で5分間反応させた。

【0048】

さらに、この溶液に10 μ lの0.5MEDTAを加えて混合した後、150 μ lのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、攪拌後15,000rpmで5分間遠心し、上清を回収した。得られた上清に、10 μ lの5M KOAc, 400 μ lのエタノールを加え攪拌し、15,

000rpm で10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を500 μ lの70%エタノールで洗い、軽く風乾後、25 μ lのDEPC処理した蒸留水に溶解した。

【0049】

〈工程2〉EcoRIアダプターの付加

前工程で得られた2本鎖cDNA25 μ lに10 μ lの5 \times T4DNA 連結緩衝液(250mM Tris-HCl pH7.6, 50mM MgCl₂, 5mM ATP, 5mM DTT, 25%(w/v), PEG8000), EcoRIアダプター溶液10 μ l(10 μ g)および5 μ l(5U)のT4 DNA ligaseを加え、16℃にて16時間反応後、50 μ lのフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、攪拌後15,000rpmで5分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に、5 μ lの5M KOAc, 125 μ lのエタノールを加え攪拌し、-80℃, 20分間冷却後、15,000rpmで10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を200 μ lの70%エタノールで洗い、軽く風乾後、40 μ lのDEPC処理した蒸留水に溶解した。

【0050】

〈工程3〉 λ gt 10とのライゲーション

サイズ分画したcDNA溶液3mlに λ gt 10(EcoRI 切断)1 μ l(50ng)を加え、11 μ lのDEPC処理した蒸留水、4 μ lの5 \times T4 DNA 連結緩衝液、1 μ lの5 \times T4 DNA リガーゼを加え室温で3時間反応させた。フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)抽出を行い、5 μ l(5 μ g)のyeast tRNA, 5 μ lの5MKOAcおよび125 μ lのエタノールを加え攪拌し、-80℃20分間冷却後、15,000rpmで10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を200 μ lの70%エタノールで洗い、軽く風乾後、5 μ lのTE(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)に溶解した。

【0051】

〈工程4〉パッケージング

工程3で得られたライゲーション後cDNAをGigapack Packaging Extracts (Stratagene)を用いてパッケージングした。すなわち、 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のライゲーション後cDNA溶液 $1 \mu\text{l}$ にキット添付のFreeze-thaw Extract $10 \mu\text{ml}$ を加えた後、さらに、キット添付のSonic Extract $15 \mu\text{l}$ を直ちに加えよく攪拌した。室温で2時間放置後、 $500 \mu\text{l}$ のファージ希釈緩衝液(100mM NaCl, 10mM MgSO_4 , 50mM Tris/HCl pH7.5, 0.01%ゼラチン)を加え、さらに、 $20 \mu\text{l}$ のクロロホルムを加えた。よく混和した後、室温で 15000rpm , 5分間遠心した上清を回収し、ファージ液を得た。常法に従い、このファージ液はクイトレーション後、ホスト大腸菌に感染させた。

【0052】

〈工程5〉ライブラリーのスクリーニング

実施例1(1)で得られたDNA断片をBcaBest DNA labeling kit (Takara)を用いて $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dCTPで標識し、プローブを作製した。このプローブを用い、前工程で得られた約40万クロンのcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、約40万個のクロンから、挿入DNA断片の最も良いクロンpUC18/mBSSP-3/1-1を得た。

【0053】

pUC18/mBSSP-3/1-1のcDNAの全長は2,597塩基対で、244塩基対の5'非翻訳領域、2283塩基対の翻訳領域、70塩基対の3'非翻訳領域から成り、その翻訳領域はセリンプロテアーゼドメイン(アミノ酸番号:517~766)をコードするばかりでなくクリングルドメイン(アミノ酸番号:85~157)ならびにスカベンジャーレセプターシステインリッチドメイン(アミノ酸番号 ドメイン1:166-266、ドメイン2:273-372、ドメイン3:386~486)を含む新規機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。pUC18/mBSSP-3/1-1のcDNAの塩基配列および予想されるアミノ酸配列を図1~6に示した。

【0054】

実施例2. mBSSP-3のNorthern blottingによる発現
部位の検討

マウス脳のtotal RNAは、トリゾル試薬（ライフテクノロジー）を用いて添付の文書に従って調製した。すなわち、マウス的大脑、脳幹、小脳および延髄を摘出したのちポリトロンでただちにホモジナイズし、組織容量の10倍量（約3ml）のトリゾル試薬を加えることにより組織を溶解した。さらに、クロロホルム600 μ lを加えて攪拌し、15,000rpm, 4℃で15分間遠心した。遠心後、水相を回収し、回収した水相に1500 μ lのイソプロパノールを加えて攪拌し、15,000rpm, 4℃で30分間遠心した。

【0055】

得られたマウスの脳の各部位の全RNAの沈殿を400 μ lのDEPC処理した後、常法に従いメンブランフィルターにブロットした。次に、pUC18/mBSSP-3/1-1を制限酵素EcoRIで消化し、約2.7kbpのDNA断片を単離・精製し、前述の方法で α -³²P dCTPで標識することによりプローブを作製した。

このプローブを前述のマウス脳各部位から調製したtotal RNAをブロットしたメンブランフィルターおよび市販の各種臓器から調製したmRNAをブロットしたメンブランフィルター（クロンテック社）と55℃で一晩ハイブリダイズさせた後、それぞれのメンブランフィルターを0.1%SDSを含む2xSSC（150mM NaCl, 15mM Sodium citrate）で室温、20分間、続いて、0.1xSSC, 0.1%SDSに替え65℃, 30分間で2回洗い、BAS-2000用イメージングプレート（富士写真フィルム）に30分間露光させた。

その結果を図13に示した。各臓器の発現では、脳、肺および腎臓で発現していることが確認された。脳の各部位では、大腦および脳幹で強い発現を認め、また、延髄でも弱い発現を認めたが、小脳での発現は認められなかった。発現は、いずれの場合も約2.7kbpの大きさのみであった。

【0056】

実施例3. ヒトBSSP-3 cDNAのクローニング

ヒト脳cDNAライブラリーは、クロンテック社より購入した。マウスBSSP-3 cDNA断片をグルタルアルデヒドを用いて蛍光標識し、プローブを作製した。このプローブを用い、約40万クローンのヒト脳cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、pUC18/hBSSP-3を得た。

【0057】

pUC18/hBSSP-3 cDNAの翻訳領域は、マウスBSSP-3 cDNAと同様にセリンプロテアーゼドメイン（アミノ酸番号：578～822）をコードするばかりでなくクリングルドメイン（アミノ酸番号：40～112）ならびにスカベンジャーレセプターシステインリッチドメイン（アミノ酸番号ドメイン1：117～217、ドメイン2：227～327、ドメイン3：334～433、ドメイン4：447～547）を含む機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。

【0058】

しかしながら、マウスBSSP-3 cDNAの一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインがマウスBSSP-3では3つであるのに対して、ヒトBSSP-3は4つであることが明らかとなった。pUC18/hBSSP-3の塩基配列および対応するアミノ酸配列を図7～12に示す。

【0059】

実施例4. ヒトBSSP-3 cDNAがコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の酵素活性の測定

(1) 発現プラスミドの構築

pUC18/hBSSP-3のDNA断片とpdKCRベクターDNA断片を常法に従いライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法により解析して目的とするセリンプロテアーゼhBSSP-3発現プラスミドpdKCR/hBSSP-3を得た。

【0060】

次に、トリプシンIIの開始メチオニンに続くシグナル配列ならびにエンテロキ

ナーゼ認識配列をコードする遺伝子を増幅し、かつ5'側上流にEcoRI, 3側下流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにプライマーを設計した。これらプライマーを用い、pCR/TrypsinIIプラスミドをテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(EcoRIおよびBspMI)

で消化後、約75bpのDNA断片を単離・精製した。同様に、ヒトBSSP-3の成熟タンパク質をコードするDNAの上流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにデザインしたプライマーを用い、pdKCR/hBSSP-3をテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(BspMIおよびBpu1102I)で消化後、DNA断片を単離・精製した。

【0061】

次に、得られたトリプシンIIのシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードするDNA断片とヒトBSSP-3の成熟タンパク質をコードするDNA断片を、常法に従い、制限酵素(BspMIおよびBpu1102I)で前消化したpdKCR/hBSSP-3ベクターにライゲーションし、大腸菌JM109を形質変換させた。形質変換したコロニーのうち目的とするキメラDNAを含むコロニーをPCR法により確認し、発現プラスミド.(pdKCR/Trp-hBSSP-3)を得た。

【0062】

(2) COS-1細胞における発現

実施例4(1)で作製したキメラ遺伝子DNAをリポフェクチン(Life Technologies)を用いてCOS-1細胞にトランスフェクションした。すなわち、直径10cmの培養用ディッシュ(Corning, 430167)に10%ウシ胎児血清を含むダルベコの最少必須培地(DMEM, 日水製薬)でCOS-1細胞を 5×10^5 細胞植え込んだ。翌日、Opti-MEM培地(Life Technologies) 5mlで細胞をリンスした後、新しい5mlのOpti-MEM培地を加え、37℃で2時間培養した。

【0063】

培養後、ディッシュ1枚あたり、上述のプラスミド1μgおよびリポフェクチン5μgの混液を加え、37℃で5時間培養した。培養後、Opti-MEM培地

を5ml加え、合計10mlとし、37℃で72時間培養した。培養後、遠心操作により培養上清を集め、酵素活性の測定サンプルとした。また、コントロールとして、発現プラスミドp d KCRのみをCOS-1細胞にトランスフェクションした培養上清も調製した。

【0064】

(3) 酵素活性の測定

実施例4(1)で得られた培養上清中の酵素活性を測定した。すなわち、COS-1細胞の培養上清45 μ lにエンテロキナーゼ(10mg/ml, Biozyme Laboratories)5 μ lを混和し、37℃で2時間反応させた。次に、DMSOに溶解した合成基質Boc-Phe-Ser-Arg-MPA(ペプチド研究所)を0.1M Tris/HCl, pH8.0で希釈した0.2M基質溶液を50 μ l加え、4℃で16時間反応させた。反応後、励起波長485nm、蛍光波長535nmにおける蛍光を測定した。その結果、Trp-hBSSP-3を発現したCOS-1細胞の培養上清をエンテロキナーゼ消化した時のみ、酵素活性を認めた。

以上の結果から、ヒトBSSP-3のセリンプロテアーゼドメインは、酵素活性を持つ機能タンパク質であることが明らかとなった。

【0065】

【発明の効果】

本発明者らは、マウス脳cDNAライブラリーから新規セリンプロテアーゼドメインばかりでなく新規クリングルドメインならびに新規スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードするマウスBSSP-3 cDNAを単離した。単離したマウスBSSP-3 cDNAは、1つのクリングルドメイン、3つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていた。また、単離したマウスBSSP-3 mRNAの発現部位の検討結果から、本発明者らは、マウスBSSP-3 mRNAが脳に強く発現していること、脳のうち特に大脳および脳幹で強く発現していることを明らかにした。

【0066】

次に、マウスBSSP-3 cDNAをプローブにして、ヒト脳cDNAライブラリーからヒトBSSP-3 cDNAを単離することに成功した。その結果、本発明者らは、ヒトBSSP-3 cDNAがマウスBSSP-3 cDNAの一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、1つのクリングルドメイン、4つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていることを明らかにした。

【0067】

さらに本発明者らは、ヒトBSSP-3 cDNAのうちセリンプロテアーゼ成熟タンパク質をコードするDNAをCOS-1細胞で発現したところ、明らかに酵素活性を持つ機能タンパク質であることを明らかにした。本発明における新規機能タンパク質は、一次構造上複合的な機能を有することが明らかであるばかりでなく、その複合的な機能を通して脳内の生理機能に一定の役割を果たしている。したがって、本発明のマウスBSSP-3 cDNAおよびマウスBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種マウス疾患モデルの病態解析に有用な手段を提供するものである。

【0068】

また、病態解析を通じて得られた疾患治療のための有用な情報を基に、本発明のヒトBSSP-3 cDNAおよびヒトBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種疾患治療剤をスクリーニングする手法を提供するものであり、さらに実際のヒト疾患治療薬の開発に適用することも可能である。その治療法としては、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療が挙げられる。

【0069】

さらに、新規機能タンパク質の各ドメイン構造のそれぞれは、単独で機能することもまた可能である。したがって、各ドメイン構造を個別に発現させた後、各ドメイン構造と相互作用を示す分子を特定することができる。また、特定した分子群の疾患への関与を調べることにより、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療も可能である。

【0070】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

配列

GTGCTCACNG CNGCBCAYTG

【0071】

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

配列

AGCGGNCCNC CDGARTCVCC

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図2】

図2はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図3】

図3はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図4】

図4はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図5】

図5はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図6】

図6はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図7】

図7はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図8】

図8はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図9】

図9はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図10】

図10はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図11】

図11はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図12】

図12はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

【図13】

図13は、マウスの各臓器におけるセリンプロテアーゼ遺伝子の転写を示すNorthern blottingの結果を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。

【書類名】

【図 1】

図面

CGAGGTGGGTGGAGTCCGGACTCCGGGCTACAGAGCTCCTGGCGCTCATCGCCTCTGG	60
CTCCAGCCTTTGCTTCGCGGGCTGACCCCTTTGGGTCCCGGTGTGATCCTCCAGCTGCC	120
CGGGGCTGGACAGCAGGCGGGCGCGGAGCGGTGGAGGGGCTCTAGGACTCTGCCG	180
GCCCCGCCCCCTCCGCGGGGACCCGAGCCAGCATGGACCACTCGGCGCCGC	240
AGCC	244
ATGGCGCTCGCCCGCTGCGTCTGGCTGTGATTTAGGGGCACTGTCTGTAGTGGCC	301
MetAlaLeuAlaArgCysValLeuAlaValIleLeuGlyAlaLeuSerValValAla	19
CGCGTGATCCGGTCTCGCGCTCTCCCTTCACCGCCCGCATCCGTCCCCACCGGTTCC	361
ArgAlaAspProValSerArgSerProLeuHisArgProHisProSerProProArgSer	39
CAACACGCGCACTACCTTCCAGCTCGCGGGGCCACCCAGGACCCCGCGTTCGCCGCTC	421
GlnHisAlaHisTyrLeuProSerSerArgArgProProArgThrProArgPheProLeu	59
CCGCTGCGGATCCCCGCTGCCCGCCGCGCAGGTCTCAGCACGGGCACACGCCCCCG	481
ProLeuArgIleProAlaAlaGlnArgProGlnValLeuSerThrGlyHisThrProPro	79
ACGATTCCACGCGCTGCGGGGCGAGAGTCGTGGGCAATGCCACCAACCTCGGCGTC	541
ThrIleProArgArgCysGlyAlaGlyGluSerTrpGlyAsnAlaThrAsnLeuGlyVal	99
CCGTGTCTACACTGGACGAGTGCCGCCCTTCTCTGGAGCGGTGCCCCCGCCAGTTGG	601
ProCysLeuHisTrpAspGluValProProPheLeuGluArgSerProProAlaSerTrp	119

【图 2】

GCTGAGCTCGAGGGCAGCCGCACAACTTCTGCCGGAGCCCGGATGGCTCGGCAGACCT	661
AlaGluLeuArgGlyGlnProHisAsnPheCysArgSerProAspGlySerGlyArgPro	139
TGGTGCTTCTATCGGAATGCCCCAGGGCAAAGTAGACTGGGCTACTGCCATTGTGGTCAA	721
TrpCysPheTyrArgAsnAlaGlnGlyLysValAspTrpGlyTyrCysAspCysGlyGln	159
GGCCCCGGCTGCCCGTCATTCGCCCTTGTGGTGGGAACAGTGGGCATGAAGTCGAGTG	781
GlyProAlaLeuProValIleArgLeuValGlyGlyAsnSerGlyHisGluGlyArgVal	179
GAGCTGTACCACGCTGGCCAGTGGGGACCATCTGTGACGACCAATGGACAATGCAGAC	841
GluLeuTyrHisAlaGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlnTrpAspAsnAlaAsp	199
GCAGACGTCACTGTAGGCAGCTGGGGCTCAGTGGCATTGCCAAAGCATGCATCAGGCA	901
AlaAspValIleCysArgGlnLeuGlyLeuSerGlyIleAlaLysAlaTrpHisGlnAla	219
CATTTGGGAAGGATCTGGCCCAATATTGTTGGATGAAGTACGCTGCACCCGGAAACGAG	961
HisPheGlyGluGlySerGlyProIleLeuLeuAspGluValArgCysThrGlyAsnGlu	239
CTGTCAATTGAGCAATGTCCAAAGAGTTCTCTGGGGCGAACAATACTGTGGCCATAAGAA	1021
LeuSerIleGluGlnCysProLysSerSerTrpGlyGluHisAsnCysGlyHisLysGlu	259

特平 9 - 2 1 3 9 6 9

【图 3】

GATGCTGGAGTGCTTGTGTCTCTAACAGATGGTGTCTATCAGACTGCCAGGAGGAAA	1081
AspAlaGlyValSerCysValProLeuThrAspGlyValIleArgLeuAlaGlyGlyLys	279
AGTACCCATGAAGTCGCCCTGGAGGTCTACTAAGGGCAGTGGGGACAGTCTGTGAT	1141
SerThrHisGluGlyArgLeuGluValTyrTyrLysGlyGlnTrpGlyThrValCysAsp	299
GATGGCTGGACTGAGATGAACACATACGTGGCTTGTCTGACTGCTGGGATTTAAATACGGC	1201
AspGlyTrpThrGluMetAsnThrTyrValAlaCysArgLeuLeuGlyPheLysTyrGly	319
AAACAGTCCTCTGTGAACCATTTTGATGGCAGCAACAGGCCCATATGGCTGGATGACGTC	1261
LysGlnSerSerValAsnHisPheAspGlySerAsnArgProIleTrpLeuAspAspVal	339
AGCTGCTCAGGAAAAGAGTCAGCTTCATTCAGTGTCCAGGAGACAGTGGGAAGGCAT	1321
SerCysSerGlyLysGluValSerPheIleGlnCysSerArgArgGlnTrpGlyArgHis	359
GACTGCAGCCATAGAGAAGATGTGGCCCTCACCTGCTATCCTGACAGCGATGGACATAGG	1381
AspCysSerHisArgGluAspValGlyLeuThrCysTyrProAspSerAspGlyHisArg	379
CTTCTCCAGGTTTCCCATCAGACTAGTGGATGGAGAGAATAAGAGGACGAGTG	1441
LeuSerProGlyPheProIleArgLeuValAspGlyGluAsnLysLysGluGlyArgVal	399

特平 9 - 2 1 3 9 6 9

【图 4】

GAGGTTTGTCAATGGCCAATGGGAACAATCTCGCATGACGGATGGACCGATAAGCAT	1501
GluValPheValAsnGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlyTrpThrAspLysHis	419
GCAGCTGTGATCTCCGGCAGCTTGGCTATAAGGGTCCTGCCAGAGCAAGGACTATGGCT	1561
AlaAlaValIleCysArgGlnLeuGlyTyrLysGlyProAlaArgAlaArgThrMetAla	439
TATTTTGGGAAGGAAAGGCCCCCATCCACATGGATAATGTGAAGTCACAGGAAATGAG	1621
TyrPheGlyGluGlyLysGlyProIleHisMetAspAsnValLysCysThrGlyAsnGlu	459
AAGGCCCTGGCTGACTGTGTCAACAAGACATTTGGAAGGCACAACCTGCCGCCACAGTGAG	1681
LysAlaLeuAlaAspCysValLysGlnAspIleGlyArgHisAsnCysArgHisSerGlu	479
GATGCAGGAGTCATCTGTGACTATTTAGAGAAGAAAGCATCAAGTAGTGTAATAAAGAG	1741
AspAlaGlyValIleCysAspTyrLeuGluLysLysAlaSerSerSerGlyAsnLysGlu	499
ATGCTCTCATCTGGATGTGGACTGAGGTTACTGCACCCGTCGGCAGAAACGGATCATTTGGT	1801
MetLeuSerSerGlyCysGlyLeuArgLeuLeuHisArgArgGlnLysArgIleIleGly	519
GGGAACAATTCTTTAAGGGGTGCCTGGCCCTTGGCAGGCTTCCCTCAGGCTGAGTCGGCC	1861
GlyAsnAsnSerLeuArgGlyAlaTrpProTrpGlnAlaSerLeuArgLeuArgSerAla	539

特平 9 - 2 1 3 9 6 9

【图 5】

CATGGAGACGGCAGGCTGCTTTGTGGAGCTACCCCTTCTGAGTAGCTGCTGGGTCCTGAQA	1921
HisGlyAspGlyArgLeuLeuCysGlyAlaThrLeuLeuSerSerCysTrpValLeuThr	559
GCTGCACACTGCTTCAAAGGTACGGAAACAACCTCGAGGAGCTATGCAGTTCGAGTTGGG	1981
AlaAlaHisCysPheLysArgTyrGlyAsnAsnSerArgSerTyrAlaValArgValGly	579
GATTATCATACTCTGGTACCAGAGGAGTTTGAACAAGAAATAGGGTTCAACAGATTGTG	2041
AspTyrHisThrLeuValProGluGluPheGluGlnGluIleGlyValGlnGlnIleVal	599
ATTCACAGGAACACAGGCCAGACAGACGACTATGACATTGCCCTGGTTAGATTGCAA	2101
IleHisArgAsnTyrArgProAspArgSerAspTyrAspIleAlaLeuValArgLeuGln	619
GGACCAGGGGAGCAATGTGCCAGACTAAGCACCCACGTTTTTGCCAGCCTGTTACCTCTA	2161
GlyProGlyGluGlnCysAlaArgLeuSerThrHisValLeuProAlaCysLeuProLeu	639
TGGAGAGAGAGGCCACAGAAAACAGCCTCCAAGTGTACATACAGGATGGGAGACACA	2221
TrpArgGluArgProGlnLysThrAlaSerAsnCysHisIleThrGlyTrpGlyAspThr	659
GGTCGTGCCCTACTCAAGAACTCTACAACAAGCTGCTGTCCTCTGTTACCCAAAGAGGTTT	2281
GlyArgAlaTyrSerArgThrLeuGlnGlnAlaAlaValProLeuLeuProLysArgPhe	679

特平 9 1 2 1 3 9 6 9

【図 6】

2341	TGTAAGAGAGGTACAAGGACTATTACTGGGAGAAATGCTCTGTGCTGGGAACCTCCAA
699	CysLysGluArgTyrLysGlyLeuPheThrGlyArgMetLeuCysAlaGlyAsnLeuGln
2401	GAAGACAACCGTGTGGACAGCTGCCAGGGAGACAGTGGAGGACCACATCATGTGTGAAAAG
719	GluAspAsnArgValAspSerCysGlnGlyAspSerGlyGlyProLeuMetCysGluLys
2461	CCTGATGAGTCCTGGGTTGTGTATGGGGTGACTTCCTGGGGTATGGATGTGGAGTCAAA
739	ProAspGluSerTrpValValTyrGlyValThrSerTrpGlyTyrGlyCysGlyValLys
2521	GACACTCCTGGAGTTATACCAGAGTCCCCGCTTTGTACCTTGGATAAAAAGTGCACC
759	AspThrProGlyValTyrThrArgValProAlaPheValProTrpIleLysSerValThr
2581	AGTCTGTAACCTTATGGAAAGCTCAAGAAAAATAGTAAAAACAGTAACCATTCAGTCTTCATA
761	SerLeu**
2614	CTTGGCACCATGCCAGAAAAAATAAAAAA

【图 7】

CCGACGACGCTCCGCGCGCTCTCCGCGCTTCCCGCGCCCCCGGGCGCTCCCT	60
ProThrArgProProProProLeuProArgPheProArgProProArgAlaLeuPro	20
GCCCAGCGCCCGCACGCCCCTCCAGCGCGGCACACGCCCCCGCGCACCCCTGGGCTGC	120
AlaGlnArgProHisAlaLeuGlnAlaGlyHisThrProArgProHisProTrpGlyCys	40
CCCCCGCGGAGCCCATGGGTCAGCGTGACGGACTTCGGCGCCCCCGTGCTGCGGTGGCG	180
ProAlaGlyGluProTrpValSerValThrAspPheGlyAlaProCysLeuArgTrpAla	60
GAGGTGCCACCCCTTCCTGGAGCGGTCGCCCCCAGCGAGCTGGGCTCAGCTCGGAGGACAG	240
GluValProProPheLeuGluArgSerProProAlaSerTrpAlaGlnLeuArgGlyGln	80
CGCCACAACCTTTGTGCGAGCCCCGACGGCGCGGCAGACCCCTGGTGTCTTCTACGGAGAC	300
ArgHisAsnPheCysArgSerProAspGlyAlaGlyArgProTrpCysPheTyrGlyAsp	100
GCCCCGTGGCAAGGTGGACTGGGGCTACTGCGACTGCAGACACGATCAGTACGACTTCGT	360
AlaArgGlyLysValAspTrpGlyTyrCysAspCysArgHisGlySerValArgLeuArg	120
GGCGGCAAAATGAGTTTGAAGGCACAGTGGAAGTATATGCAAGTGGAGTTTGGGGCAGCT	420
GlyGlyLysAsnGluPheGluGlyThrValGluValTyrAlaSerGlyValTrpGlyThr	140

特平 9 - 2 1 3 9 6 9

【图 8】

GTCTGTAGCAGCCACTGGGATGATTCTGATGCATCAGTCATTGTCCAGCTGCAGCTG	480
ValCysSerSerHisTrpAspSerAspAlaSerValIleCysHisGlnLeuGlnLeu	160
GGAGGAAAGGAATAGCAAAACCCCGTTTCTGGACTGGGCCCTTATTCCCATTTAT	540
GlyGlyLysGlyIleAlaLysGlnThrProPheSerGlyLeuGlyLeuIleProIleTyr	180
TGGAGCAATGTCCGTTGCCGAGGAGATGAAGAAAAATATACTGCTTTGTGAAAAGACATC	600
TrpSerAsnValArgCysArgGlyAspGluGluAsnIleLeuLeuCysGluLysAspIle	200
TGGCAGGGTGGGTGTGTCCTCAGAAAGATGGCAGCTGCTGTACGTAGCTTTTCCCAT	660
TrpGlnGlyGlyValCysProGlnLysMetAlaAlaValThrCysSerPheSerHis	220
GGCCCAACGTTCCCATCATTCGCCCTTGCTGGAGGCAGCAGTGTGCATGAAGCCGGGTG	720
GlyProThrPheProIleIleArgLeuAlaGlyGlySerSerValHisGluGlyArgVal	240
GAGCTCTACCATGCTGGCCAGTGGGGAACCGTTTGTGATGACCAATGGGATGATGCCGAT	780
GluLeuTyrHisAlaGlyGlnTrpGlyThrValCysAspAspGlnTrpAspAlaAsp	260
GCAGAAGTGATCTGCAGGCAGCTGGGCCTCAGTGGCATTGCCAAAGCATGGCATCAGGCA	840
AlaGluValIleCysArgGlnLeuGlyLeuSerGlyIleAlaLysAlaTrpHisGlnAla	280

特平 9 - 2 1 3 9 6 9

【図9】

TATTTGGGAAGGTCTGGCCAGTTATGTTGGATGAAGTACGCTGCACCTGGGAATGAG	900
TyrPheGlyGluGlySerGlyProValMetLeuAspGluValArgCysThrGlyAsnGlu	300
CTTTCAAATTGAGCAGTGTCCTCCAAAGAGCTCCTGGGAGAGCATAACTGTGGCCATAAAGAA	960
LeuSerIleGluGlnCysProLysSerSerTrpGlyGluHisAsnCysGlyHisLysGlu	320
GATGCTGAGTGTCCTGTACCCCTCTAACAGATGGGTCATCAGACTTGCAGGTGGGAAA	1020
AspAlaGlyValSerCysThrProLeuThrAspGlyValIleArgLeuAlaGlyGlyLys	340
GGCAGCCATGAGGTCGCTGGAGGTATATTACAGAGCCAGTGGGAACTGTCTGTGAT	1080
GlySerHisGluGlyArgLeuGluValTyrTyrArgGlyGlnTrpGlyThrValCysAsp	360
GATGGCTGGACTGAGCTGAATACATACGTGGTTTGTCCGACAGTTGGGATTTAAATATGGT	1140
AspGlyTrpThrGluLeuAsnThrTyrValValCysArgGlnLeuGlyPheLysTyrGly	380
AAACAAGCATCTGCCCAACCATTTTGAAGAAAGCACAGGGCCCATATGGTTGGATGACGTC	1200
LysGlnAlaSerAlaAsnHisPheGluGluSerThrGlyProIleTrpLeuAspVal	400
AGCTGCTCAGGAAAGGAAACCAGATTCTTTCAGTGTTCAGGCGACAGTGGGAAGGCAT	1260
SerCysSerGlyLysGluThrArgPheLeuGlnCysSerArgArgGlnTrpGlyArgHis	420

【图 10】

GACTGCAGCCACCGGAAGATGTTAGCATTCCTGCTACCTGGCGGCGGACACAGG	1320
AspCysSerHisArgGluAspValSerIleAlaCysTyrProGlyGlyGluGlyHisArg	440
CTCTCTCTGGGTTTTCCTGTCAGACTGATGGATGGAGAAAATAAGAAAGACGAGTG	1380
LeuSerLeuGlyPheProValArgLeuMetAspGlyGluAsnLysLysGlyArgVal	460
GAGGTTTATCAATGGCCAGTGGGAACAATCTGTGATGATGGACTGATAAGGAT	1440
GluValPheIleAsnGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlyTrpThrAspLysAsp	480
GCAGCTGTGATCTGTCGTCAGCTTGGCTACAAGGGTCTGCCAGAGCAAGAACCATGGCT	1500
AlaAlaValIleCysArgGlnLeuGlyTyrLysGlyProAlaArgAlaArgThrMetAla	500
TACTTTGGAGAAAGGAAAGACCCATCCATGTGGATAATGTGAAGTGCACAGGAAATGAG	1560
TyrPheGlyGluGlyLysGlyProIleHisValAspAsnValLysCysThrGlyAsnGlu	520
AGGTCCTTGGCTGACTGTATCAAGCAAGATATTGGAAGACACAACCTGCCGCCACAGTGAA	1620
ArgSerLeuAlaAspCysIleLysGlnAspIleGlyArgHisAsnCysArgHisSerGlu	540
GATGCAGGAGTTATTTGTGATTATTTTGGCAAGAAGGCCCTCAGGTAACAGTAATAAAGAG	1680
AspAlaGlyValIleCysAspTyrPheGlyLysLysAlaSerGlyAsnSerAsnLysGlu	560

特平 9 - 2 1 3 9 6 9

TCCCTCTCATCTGTTGTGGCTTGAGATTACTGCACCGTCGGCAGAAAGCGATCATTTGGT	1740
SerLeuSerSerValCysGlyLeuArgLeuLeuHisArgArgGlnLysArgIleIleGly	580
GGGAAAATTCCTTAAGGGTGGTTGGCCTTGGCAGGTTCCCTCCGGCTGAAGTCATCC	1800
GlyLysAsnSerLeuArgGlyGlyTrpProTrpGlnValSerLeuArgLeuLysSerSer	600
CATGGAGATGGCAGGCTCCTCTGCGGGGCTACGCTCCTGAGTAGCTGCTGGGTCCCTCACA	1860
HisGlyAspGlyArgLeuLeuCysGlyAlaThrLeuLeuSerSerCysTrpValLeuThr	620
GCAGCACACTGTTCAAGAGGTATGGCAACAGCAGCTAGGAGCTATGCTGTTAGGGTTGGA	1920
AlaAlaHisCysPheLysArgTyrGlyAsnSerThrArgSerTyrAlaValArgValGly	640
GATTATCATACTCTGGTACCAGAGGAGTTTGAGGAAGAAATTGGAGTTCAACAGATTGTG	1980
AspTyrHisThrLeuValProGluGluPheGluGluIleGlyValGlnGlnIleVal	660
ATTCATCGGGAGTATCGACCCGACCGCAGTGATTATGACATAGCCCTGGTTAGATTACAA	2040
IleHisArgGluTyrArgProAspArgSerAspTyrAspIleAlaLeuValArgLeuGln	680
GGACCAGAAGAGCAATGTGCCAGATTACAGAGCCATGTTTGGCCAGCCTGTTTACCACATC	2100
GlyProGluGluGlnCysAlaArgPheSerSerHisValLeuProAlaCysLeuProLeu	700

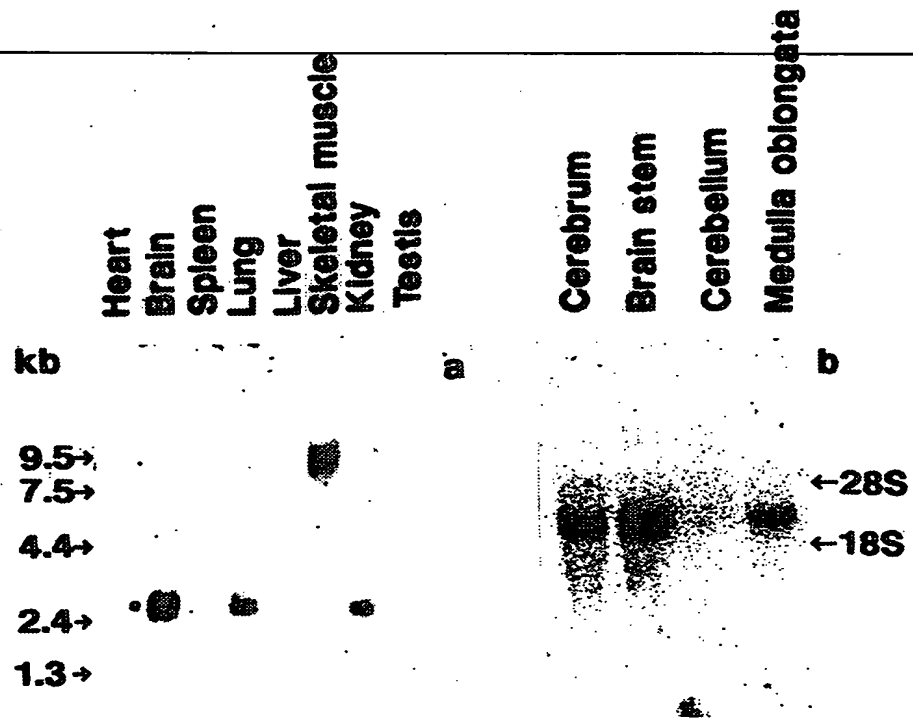
特平 9 - 2 1 3 9 6 9

【図 1 2】

2160	TGGAGAGAGGCCACAGAAAACAGCATCCAACGTGTTACATAACAGGATGGGTGACACA
720	TrpArgGluArgProGlnLysThrAlaSerAsnCysTyrIleThrGlyTrpGlyAspThr
2220	GGACGAGCCCTATTCAAGAACACTACAACAAGCAGCCATTCCCTTACTTCCATAAAGGTTT
740	GlyArgAlaTyrSerArgThrLeuGlnGlnAlaIleProLeuLeuProLysArgPhe
2280	TGTGAACAACGTTATAAGGTCGGTTTACAGGGAGAAATGCTTTGTGCTGGAAACCTCCAT
760	CysGluGluArgTyrLysGlyArgPheThrGlyArgMetLeuCysAlaGlyAsnLeuHis
2340	GAACACAAACGCGTGGACAGCTGCCAGGGAGACAGCGGAGACCACATCATGTGTGAACGG
780	GluHisLysArgValAspSerCysGlnGlyAspSerGlyGlyProLeuMetCysGluArg
2400	CCCGGAGAGAGCTGGTGGTGTATGGGGTGACCTCCTCGGGGTATGGCTGTGGAGTCAAG
800	ProGlyGluSerTrpValValTyrGlyValThrSerTrpGlyTyrGlyCysGlyValLys
2460	GATTCTCCTGGTGTATACCAAAGTCTCAGCCTTTGTACCTTGGATAAAAAGTGTACCC
820	AspSerProGlyValTyrThrLysValSerAlaPheValProTrpIleLysSerValThr
2520	AAACTGTAATTCTTCATGGAAACTTCAAAGCAGCATTTAAACAAATGGAAAACTTTGAAC
822	LysLeu**
2562	CCCCACTATTAGCACTCAGCAGAGATGACAAACAAACGGCAAG

【図13】

図面代用写真



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なヒト・セリンプロテアーゼの提供。

【解決手段】 図7～図12に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000001904
【住所又は居所】	大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
【氏名又は名称】	サントリー株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100077517
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビ ル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】	石田 敬
【代理人】	申請人
【識別番号】	100087871
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビ ル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】	福本 積
【代理人】	申請人
【識別番号】	100088269
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビ ル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】	戸田 利雄
【代理人】	申請人
【識別番号】	100082898
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビ ル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】	西山 雅也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

氏 名 サントリー株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)